

IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE BACTERIAS EN *Eisenia foetida* Savigny CULTIVADAS, CON POTENCIAL DE REMOCIÓN DE CONTAMINANTES ORGÁNICOS PERSISTENTES

MOLECULAR IDENTIFICATION OF CULTIVATED BACTERIA IN *Eisenia foetida* Savigny, WITH THE POTENTIAL FOR REMOVAL OF PERSISTENT ORGANIC CONTAMINANTS

Villalobos-Maldonado, J.J.^{1*}; Meza-Gordillo, R.¹; Enciso-Sáenz, S.¹; Castañón-González, J.H.¹; Rosales-Quintero, A.¹; Lagunas-Rivera, S.¹; Gutiérrez-Miceli, F.A.¹; Ruiz-Valdiviezo, V.M.¹; Rincón-Rosales, R.¹

¹Laboratorio de Biotecnología, Instituto Tecnológico de Tuxtla-Gutiérrez, Carr. Panamericana km. 1080, Tuxtla-Gutiérrez, Chiapas, México.

*Autor responsable: juanjovillam@hotmail.com

RESUMEN

Se evaluó el uso de métodos cultivables para aislar y caracterizar genotípicamente las bacterias asociadas con el intestino de la lombriz de tierra (*Eisenia foetida* Savigny), identificando algunos géneros reportados con un potencial de remoción de contaminantes orgánicos persistentes (COPs). Las lombrices de tierra analizadas en adición con peat moss y estiércol de conejo a nivel de laboratorio, integraron un sistema de vermicompostaje que fue capaz de remover 96%, del contaminante decaclorobifenilo a una concentración de 200 mg kg⁻¹ durante 91 días. A partir de cepas bacterianas puras aisladas del tracto digestivo de la lombriz, se procedió a extraer el DNA genómico y se amplificó el gen 16S rDNA a partir del DNA extraído de las cepas, usando los primers fd1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y rD1 (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3'). Todas las secuencias de las cepas fueron analizadas usando el programa BioEdit v.6 y alineadas con CLUSTAL W, los árboles filogenéticos fueron construidos a través del programa MEGA v.5.2, utilizando el modelo evolutivo Tamura-Nei. La posición taxonómica de las cepas fueron determinadas conforme a las secuencias parciales del gen cromosomal 16S rDNA de cepas bacterianas tipo, el cual identificó a los género *Bacillus*, *Caryophanon*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*.

Palabras clave: Lombriz de tierra, compuestos orgánicos persistentes (COPs), vermicomposteo, gen 16S rDNA.

ABSTRACT

The use of cultivable methods used to isolate and characterize genotypically the bacteria associated to the intestine of the earthworm (*Eisenia foetida* Savigny) was evaluated, identifying some genera reported with a potential for removal of persistent organic contaminants (POCs). The earthworms analyzed in addition to peat moss and rabbit manure at the laboratory level established a vermicompost system that was capable of removing 96 % of the decachlorobiphenyl contaminant at a concentration of 200 mg kg⁻¹ for 91 days. From the pure bacteria strains isolated from the digestive tract of the earthworm, the genomic DNA was extracted and the 16S rDNA gene was amplified, from the DNA extracted from the strains, using the primers fd1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and rD1 (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3'). All the sequences of the strains were analyzed using the BioEdit v.6 software and aligned with CLUSTAL W, the phylogenetic trees were built through the MEGA v.5.2 software, using the Tamura-Nei evolutionary model. The taxonomic positions of the strains were determined based on the partial sequences of the chromosome gene 16S rDNA from type bacterial strains, which identified the genera *Bacillus*, *Caryophanon*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*.

Keywords: earthworms, persistent organic compounds (POCs), vermicompost, 16S rDNA gene.

Agroproductividad: Vol. 10, Núm. 5, mayo. 2017. pp: 51-56.

Recibido: septiembre, 2016. **Aceptado:** abril, 2017.

INTRODUCCIÓN

Los contaminantes orgánicos persistentes (COPs) son sustancias sintéticas de alto riesgo para la salud humana y del medio ambiente. Estas sustancias se han encontrado en todo el mundo, incluyendo en algunas áreas muy remotas en donde no se utilizaron dichos contaminantes, por ejemplo, en regiones polares, también en poblaciones humanas e incluso la leche materna (Mac Donald *et al.*, 2000; Pólder *et al.*, 2003; She *et al.*, 2007). Para atender este problema a nivel mundial, fue firmado el 23 de mayo de 2001, el Convenio de Estocolmo. Donde se enumeran y describen las propiedades de los COPs de la siguiente manera: "contaminantes orgánicos persistentes tienen propiedades tóxicas, se bioacumulan y son transportados por el aire, agua y por especies migratorias a través de las fronteras internacionales y depositados lejos del lugar de su liberación, acumulándose en los ecosistemas terrestres y acuáticos". Los bifenilos policlorados (PCBs) son una familia de compuestos producidos comercialmente por cloración progresiva de bifenilo en presencia de cloruro férrico y yoduro férrico (Abramowicz, 1990, la OMS 1993). Las lombrices de tierra pueden tolerar los productos químicos tóxicos en el medio ambiente (COPs). Los efectos de las lombrices de tierra sobre los microorganismos son directos (aumento o disminución de sus poblaciones para digerir el sustrato) e indirecta (que se derive de los efectos directos, tales como la aparición de excrementos en sustrato fresco), Aira y Domínguez (2010). Estos son ingeridos por los invertebrados, realizando una Anisosimbiosis mutualista, degradando así los compuestos complejos por medio de las enzimas (Figura 1).

La lombriz de tierra (*Eisenia foetida* Savigny) participa en los diferentes procesos ecosistémicos, tales como la formación del suelo, regularización y suministro de agua para la actividad mecánica en el suelo debido a su capacidad de moverse, creación de estructuras que mejora la aireación y la infiltración de agua, degradación de la materia orgánica y mezcla de tierra, de la cual, parte de ésta degradación se debe a su interacción con la microflora mutualista que se encuentra en su tracto digestivo. Se sabe que las lombrices de tierra pueden acelerar la remoción de contaminantes orgánicos tales como plagui-

cidas, herbicidas, hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH), aceites crudos y los bifenilos policlorados (PCBs). El objetivo de esta investigación consistió en aplicar métodos cultivables que permitieron el aislamiento y caracterización genotípica de bacterias asociadas con el intestino de la lombriz de tierra (*Eisenia foetida* Savigny), encontrándose algunos géneros reportados en la remoción de compuestos orgánicos persistentes (COPs).

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta y procedimiento del material biológico

Se seleccionaron diez lombrices de un vermireactor adaptadas con estiércol y peat moss de la misma población que se utilizaron en la remoción del decaclorobifenilo, sexualmente maduras es decir con clitelo formado y se lavaron con agua destilada estéril, quedando libres de impurezas externas. Utilizando un estereoscopio, cada lombriz fue disectada transversalmente, extrayendo los contenidos intestinales, aproximadamente 1 g (Figura 2), el contenido se colocó en un tubo con 9 mL del medio de infusión de cerebro y corazón (IHB) obteniendo la solución base 10^{-1} , para realizar diluciones hasta llegar a 10^{-8} . Las diluciones de 10^{-4} a 10^{-8} se sembraron por triplicado en los siguientes medios de cultivo Agar nutritivo (AN) para aislamiento de bacterias poco exigentes; Agar de soya tripticaseína (AST), provee un soporte de crecimiento para organismos anaerobios y aerobios y fuente de nitrógeno y minerales; Medio King A (KA) para la detección de especies del género *Pseudomonas*; Agar

de Infusión Cerebro y Corazón (ABHI) es un medio apropiado para el cultivo de bacterias y hongos, incluyendo los de difícil desarrollo; Agar Rojo Congo (RC) tiene afinidad por los polisacáridos, diferenciación de cepas patógenas y aislamiento de bacterias fijadoras de nitrógeno. Las placas se incubaron por

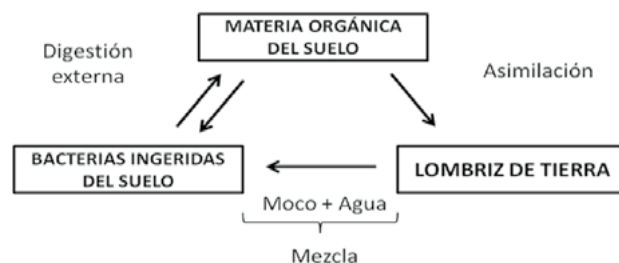


Figura 1. Sistema de digestión mutualista de lombrices de tierra tropicales endogénicas. Barois y Lavelle (1986).

48 h a 30 °C, enseguida se hizo una selección de cepas con base en su crecimiento y morfología, conteo de las unidades formadoras de colonias, para posteriormente realizar resiembras para su aislamiento y purificación (Brito-Vega *et al.*, 2009).

Caracterización genética de bacterias del tracto digestivo de la lombriz

A partir de cepas bacterianas puras aisladas del tracto

digestivo de la lombriz de tierra, se procedió a extraer el DNA genómico, utilizando el kit ZR Fungal/Bacterial DNA MicroPrep™ de la marca ZYMO RESEARCH. La mezcla de reacción para la técnica PCR-16S rDNA y cebadores utilizados fue mediante la amplificación del gen 16S rDNA a partir del DNA extraído de las cepas, usando los primers rD1 y fD. Weisburg et al. (1991), a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los productos de PCR para amplificar el gen 16S rDNA fueron purificados, usando el kit "PCR product purification system" de la marca Roche™. Los productos de PCR purificados fueron secuenciados en el Centro de Ciencias Genómicas-UNAM, en la Ciudad de Cuernavaca, Morelos.

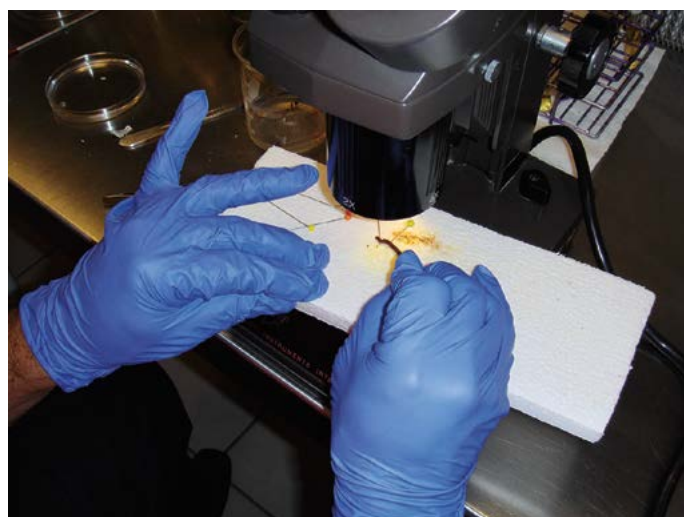


Figura 2. Disección transversal de lombriz de tierra (*Eisenia foetida* Savigny).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El Cuadro 1, muestra los resultados de las cepas de interés provenientes de los medio de cultivo utilizados para el crecimiento de bacterias aisladas del tracto digestivo de las lombrices, (Figura 3) crecimiento bacteriano en Agar nutritivo.

Extracción de DNA

La Figura 4, presenta las electroforesis del DNA de 10 cepas aisladas a partir del tracto gastrointestinal de *Eisenia foetida*, mostradas en el Cuadro 1. En el primer carril se observa el marcador de peso molecular de 1 kb y en los siguientes el DNA de las cepas.

Amplificación del gen 16S rDNA

A las 10 cepas se les realizó la amplificación del gen 16S rDNA, los fragmentos amplificados (Figura 5), con un tamaño estimado de 1500 pb. De las 10 cepas mostradas siete amplificaron y posteriormente se realizó otra electroforesis donde amplificó la cepa RC4-1, totalizando ocho, las cepas KA4-2 y AN5-1 no amplificaron en los dos intentos realizados.

Géneros aislados en el tracto digestivo de la lombriz

Todas las secuencias de las cepas fueron analizadas usando el programa BioEdit v.6 y alineadas con CLUSTAL W, los árboles filogenéticos fueron construidos a través del programa MEGA v.5.2. La posición taxonómica de la cepas fueron determinadas conforme al análisis filogenético realizado con las secuencias parciales del gen cromosomal 16S rDNA de cepas bacterianas tipo, son cepas puras de laboratorios oficiales para la colección de germoplasma y material genético generado en diferentes investigaciones en el mundo (ejemplo: American Type Culture Collection-ATCC). La secuencia de los genes 16S rDNA de la cepas aisladas del intestino de la lombriz de tierra *Eisenia foetida*

Cuadro 1. Cepas seleccionadas para la extracción del DNA.

Cepa	Medio de origen	Simbología	Características
1	RC4-2	Medio Rojo congo, dilución 10^{-4} , segunda caja	Bacilos con esporas, G (—)
2	RC5-2	Medio Rojo congo, dilución 10^{-5} , segunda caja	Sarcinas, G (—)
3	RC4-1	Medio Rojo congo, dilución 10^{-4} , primera caja	Cocos pequeños en racimos, G (—)
4	KA4-1	Medio King A, dilución 10^{-4} , primera caja	Células alargadas flageladas, G (—)
5	KA4-2	Medio King A, dilución 10^{-4} , segunda caja	Bacilos pequeños en racimos, G (—)
6	AST4-2	Medio Agar de Soya Tripticaseína, dilución 10^{-4} , segunda caja.	Bacilos grandes, G (—)
7	AN4-3	Medio Agar nutritivo, dilución 10^{-4} , tercera caja	Bacilos grandes alargados, G (—)
8	AN5-1	Medio Agar nutritivo, dilución 10^{-5} , primera caja	Cocos, G (—)
9	AN4-1	Medio Agar nutritivo, dilución 10^{-4} , primera caja	Bacilos medianos, G (—)
10	AN4-4*	Medio Agar nutritivo, dilución 10^{-4} , cuarta caja agregada *	Bacilos-coco pequeños, G (—)

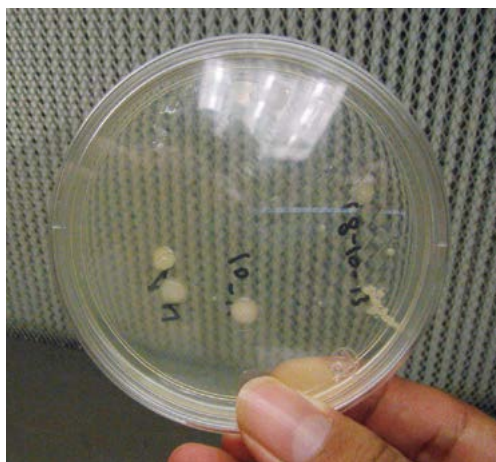


Figura 3. Crecimiento de colonias en el medio de cultivo agar nutritivo.

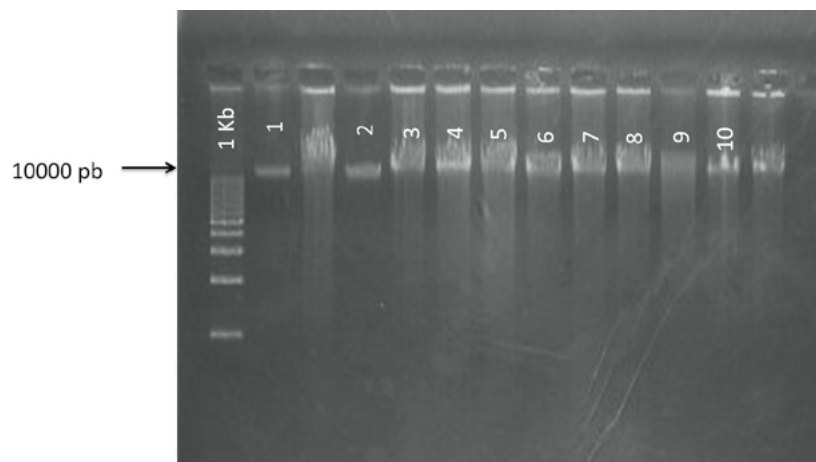


Figura 4. Electroforesis de la extracción de DNA de las cepas aisladas.

fueron depositadas en la base de datos Ribosomal Database Project (Michigan State University), que contiene cepas tipo, que a su vez la secuencia en estudio fue comparada con estas cepas con mayor porcentaje de similitud genética y las seleccionadas fueron depositadas en el GenBank del Centro Nacional de Información Biotecnológica (www.ncbi.nlm.nih.gov/), para la reconstrucción del árbol filogenético utilizando el método estadístico de máxima verosimilitud, indicando la ubicación taxonómica (Cuadro 2) de las cepas Villa-01 a la Villa-08 y su similitud genética con otras cepas bacterianas tipo.

La cepa en estudio Villa-01 fue asociada con el género *Bacillus* y mostró 68.3% de similitud genética con la cepa *Bacillus oceanisediminis* H2^T, con número de ascensión GQ292772.

Las secuencias se analizaron usando el programa BioEdit v.6 y la ubicación taxonómica y construcción del árbol filogenético de las bacterias fue realizado a través del programa MEGA v.5.2, usando el modelo evolutivo Tamura-Nei y el método estadístico de máxima verosimilitud (Figura 6).

Autores como Hong *et al.* (2011), reporta-

ron bacterias aerobias pertenecientes a los géneros *Aeromonas*, *Bacillus*, *Photobacterium*, *Pseudomonas* y *Shewanella*, y bacterias anaeróbicas de los géneros *Aeromonas*, *Bacillus*, *Shewanella*, *Paenibacillus*, *Clostridium*, *Cellulosimicrobium*, *Streptomyces* y *Chloroflexi*. Algunos de estos géneros tales como *Bacillus*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* y *Shewanella* se han reportado como cepas degradadoras de contaminantes (Khalid *et al.*, 2008; Tiquia, 2010; Wu *et al.*, 2011b; Yee *et al.*, 1997). *Sphingomonadaceae* (*Alphaproteobacteria*) y *Alcaligenes* spp. (*Proteobacterias*) han sido reportados por mantener sus diversidades durante su tránsito por el intestino de las lombrices a partir de muestras de sus deyecciones (Nechitaylo *et al.*, 2010). Bernard *et al.* (2012), encontraron que la comunidad microbiana cambió con la aplicación de materia orgánica. La paja promovió las Protobacterias *Bacteroidetes*

y *Actinobacteria*. El ambiente, la comida y las interacciones ecológicas podrían por lo tanto regular la comunidad microbiana asociada al intestino, deyecciones de las lombrices de tierra y suelos.

CONCLUSIONES

Este estudio, permitió determinar que el género *Bacillus* fue el que presentó la mayor abundancia de

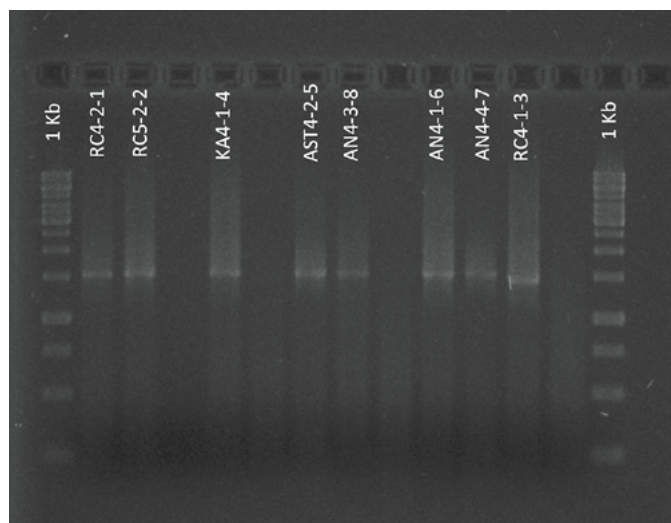
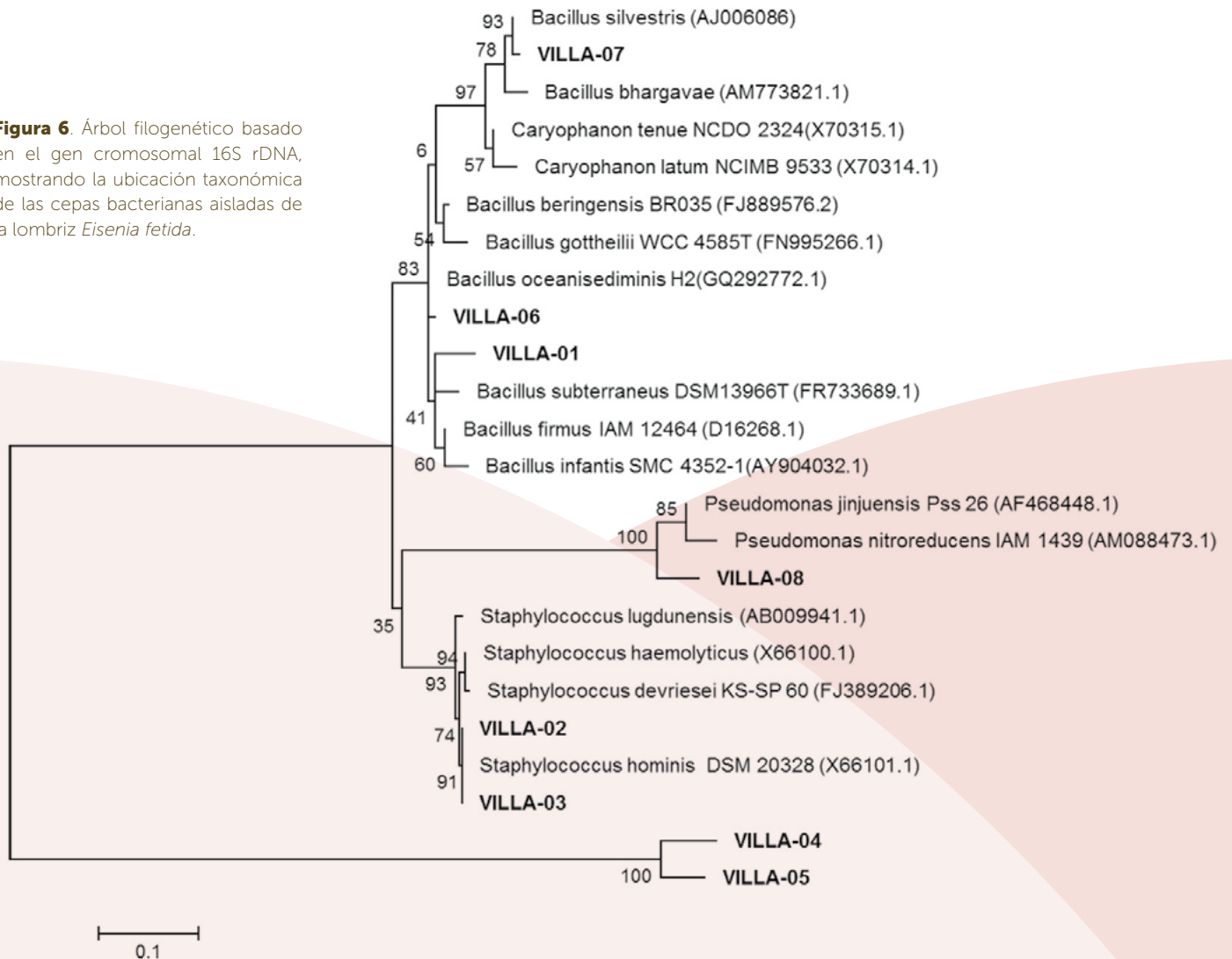


Figura 5. Electroforesis de la amplificación del gen 16S rDNA.

Cuadro 2 Géneros aislados del intestino de la lombriz de tierra (*Eisenia fetida*).

Cepa secuenciada	Pares de bases de la secuencia	Género asociado	(%) de similitud genética	Similitud con la cepa bacteriana tipo	Número de Ascensión en (NCBI)
Villa-01	984	<i>Bacillus</i>	68 %	<i>Bacillus oceanisediminis</i> H2 ^T	GQ292772
Villa-02	1462	<i>Staphylococcus</i>	97 %	<i>Staphylococcus hominis</i> DSM20328 ^T	X66101
Villa-03	1362	<i>Staphylococcus</i>	93 %	<i>Staphylococcus devriesei</i> KS-SP60 ^T	FJ389206
Villa-04	766	<i>Bacillus</i>	94 %	<i>Bacillus firmus</i> IAM12464 ^T	D16268
Villa-05	792	<i>Bacillus</i>	65 %	<i>Bacillus silvestris</i> HR3-23 ^T	AJ006086
Villa-06	1447	<i>Bacillus</i>	86 %	<i>Bacillus infantis</i> SMC4352-1 ^T	AY904032
Villa-07	1172	<i>Caryophanon</i>	83 %	<i>Caryophanon tenue</i> NCDO2324 ^T	X70315
Villa-08	939	<i>Pseudomonas</i>	64 %	<i>Pseudomonas jinjuensis</i> Pss 26 ^T	AF468448

Figura 6. Árbol filogenético basado en el gen cromosomal 16S rDNA, mostrando la ubicación taxonómica de las cepas bacterianas aisladas de la lombriz *Eisenia fetida*.

cepas y también fue interesante encontrar representantes del género *Pseudomonas*, ambos géneros bacterianos han sido estudiados por su importancia, en la fijación de nitró-

geno y sobre todo en la biorremediación de suelos contaminados, con hidrocarburos policíclicos aromáticos y compuestos orgánicos persistentes. Las lombrices de tierra

tienen un sistema digestivo complejo en el cual las bacterias en su intestino conviven de forma mutualista y benefician la degradación del material orgánico ingerido.

LITERATURA CITADA

- Abramowicz D.A. 1990. Aerobic and anaerobic biodegradation of PCBs: A review. *Critical Rev. Biotechnol.* 10, 241-251.
- Aira M., Domínguez J. 2010. Las lombrices de tierra y los microorganismos: desentrañando la caja negra del vermicompostaje. *Acta zoológica mexicana.* 2, 385-395.
- Barois I., Lavelle P. 1986. Changes in respiration rate and some physicochemical properties of a tropical soil during transit through *Pontoscolex corethrurus* (Glossoscolecidae, Oligochaeta). *Soil Biol. Biochem.* 18, 539-541.
- Bernard L., Chapuis-Lardy L., Razafimbelo T., Razafindrakoto M., Pablo A.L., Legname E., Poulain J., Bruls T., O'Donohue M., Brauman A., Chotte J.L., Blanchart E. 2012. Endogeic earthworms shape bacterial functional communities and affect organic matter mineralization in a tropical soil. *ISME J.* 6, 213-222.
- Brito-Vega H., Espinosa-Victoria D. 2009. Bacterial Diversity in the Digestive Tract of Earthworms (Oligochaeta). *Journal of Biological Sciences.* 9, 192-199.
- Hong S.W., Kim I.S., Lee J.S., Chung K.S. 2011. Culture-based and denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the bacterial community structure from the intestinal tracts of earthworm (*Eisenia fetida*). *J. Microbiol. Biotechnol.* 21, 885-892.
- Khalid A., Arshad M., Crowley D.E. 2008. Decolorization of azo dyes by *Shewanella* sp under saline conditions. *Appl. Microbiol. Biot.* 79, 1053-1059.
- Macdonald R.W., Barrie L.A., Bidleman T.F., Diamond M.L., Gregor D.J., Semkin R.G., et al. 2000. Contaminants in the Canadian Arctic: 5 years of progress in understanding sources, occurrence and pathways. *Sci. Total Environ.* 254, 93-234.
- Nechitaylo T.Y., Yakimov M.M., Godinho M., Timmis K.N., Belogolova E., Byzov B.A., Kurakov A.V., Jones D., Golyshin L.P.N. 2010. Effect of the earthworms *Lumbricus terrestres* and *Aporrectodea caliginosa* on bacterial diversity in soil. *Microbial. Ecol.* 59, 574-587.
- OMS. 1993. Polychlorinated biphenyls and terphenyls, En: *Environmental Health Criteria* 140, 2a.Edition, World Health Organization, Geneva.
- Polder A., Odland J.O., Tkachev A., Foreid S., Savinova T.N., Skaare J.U. 2003. Geographic Variation of Chlorinated Pesticides, Toxaphenes and PCBs in Human Milk from Sub-Arctic Locations in Russia. *Sci. Total Environ.* 306, 179-195.
- She J., Holden A., Sharp M., Tañer M., Williams-Derry C., Hooper K. 2007. Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs) and Polychlorinated Biphenyls (PCBs) in Breast Milk from the Pacific Northwest, *Chemosphere.* 67, S307-S317.
- Tiquia S.M. 2010. Salt-adapted bacteria isolated from the rouge river and potential for degradation of contaminants and biotechnological applications. *Environ. Technol.* 31, 967-978.
- Weisburg W.G., Barns S.M., Pelletier D.A., Lane D.J. 1991. 16S ribosomal amplication for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173, 697-703. (www.ncbi.nlm.nih.gov/).
- Wu X., Monchy S., Taghavi S., Zhu W., Ramos J., Van del Lelie D. 2011b. Comparative genomics and functional analysis of niche-specific adaptation in *Pseudomonas putida*. *FEMS Microbial. Rev.* 35, 299-323.
- Yee D.C., Wood T.K. 1997. 2-4-Dichlorophenol degradation using *Streptomyces viridosporus* T7A lignin peroxidase, *Biotechnol. Progr.* 13, 53-59.

